

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-120874

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和60年(1985)6月28日  
 C 07 D 309/32 A 61 K 31/365 ADU 6640-4C  
 ADZ 6760-4B  
 C 12 P 1/06 6971-4B ※審査請求 未請求 発明の数 4 (全15頁)  
 17/06

⑮ 発明の名称 CL-1957B 抗菌性化合物およびその製法

⑯ 特 願 昭59-188977

⑰ 出 願 昭59(1984)9月11日

優先権主張 ⑱ 1983年9月12日 ⑲ 米国(US) ⑳ 531128

㉑ 発 明 者 ジェラード・シー・ホ アメリカ合衆国ミシガン州 48105 アンアーバー・アン  
 ウカンソン テイタム 2408  
 ㉒ 発 明 者 ジョン・ビー・ショール アメリカ合衆国ミシガン州 48197 イブシランティ・ウ  
 ムバーグ エストム・アランド 1205  
 ㉓ 発 明 者 ジェイムズ・シー・フ アメリカ合衆国ミシガン州 48105 アンアーバー・ラム  
 レンチ ゼー 3150  
 ㉔ 出 願 人 ワーナー・ランバー アメリカ合衆国ニュージャージー州 07950 モーリスブ  
 ト・コンパニー レインズ・テイバーロード 201

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称 OL-1957B 抗菌性化合物およびその製法

2. 特許請求の範囲

- 1) (a) 556の原子質量単位の分子量、  
 (b) 49~52℃(先だつて軟化する)の融点、  
 (c)  $[\alpha]_D^{25} - 156^\circ$  (クロロホルム中0.82%)  
 の旋光度  
 (d) 289nm ( $\epsilon = 0.33$ )で吸収極大および  
 260nm以下で末端吸収を示すメタノール  
 中の紫外線吸収スペクトル(遊離成形態)、  
 (e) 240nm ( $\epsilon = 0.75$ )および385nm ( $\epsilon = 0.24$ )で極大を示すメタノール中の紫外  
 線吸収スペクトル(カルボキシレート陰イ  
 オン形態)、  
 (f) 2970、2940、1715、1700(シヨル  
 ダー)、1640、1455、1375、1250、

1100および965 $\text{cm}^{-1}$ で主要な吸収ピー  
 クを示すクロロホルム溶液中の赤外線スペ  
 クトル、

- (g) 0.76(二重線、3プロトン)、0.95(二  
 重線、3-プロトン)、1.03(三重線、3  
 -プロトン)、1.05(二重線、3プロトン)、  
 1.17(二重線、3-プロトン)、1.74(多  
 重線、1プロトン)、1.84(単一線、3プ  
 ロトン)、1.91(二重線の二重線、1プロ  
 トン)、2.06(多重線、2プロトン)、  
 2.11(単一線、3プロトン)、2.15(多重  
 線、1プロトン)、2.18(四重線、2プロ  
 トン)、2.52(多重線、1プロトン)、  
 2.65(多重線、1プロトン)、2.78(多重  
 線、1プロトン)、3.60(多重線、2プロ  
 トン)、3.85(多重線、2プロトン)、  
 4.96(二重線の二重線、1プロトン)、

5.02(二重線、1プロトン)、5.20(二重線、1プロトン)、5.61(二重線の二重線、1プロトン)、5.66(単一線、1プロトン)、5.69(二重線の二重線、1プロトン)、5.98(二重線、1プロトン)、5.99(二重線、1プロトン)、および、6.93(二重線の二重線、1プロトン)(テトラメチルシランからダウンフィールドした1ミリオン当りの部数)においてシグナルを示すジユウテロクロロホルム溶液中の360 MHzプロトン磁気共鳴スペクトルおよび、

- (b) 214.97、170.60、164.40、160.95、151.97、139.36、136.80、135.62、134.90、130.26、138.90、122.69、122.08、120.05、116.81、81.55、73.99、62.61、53.84、47.96、45.66、40.82、33.64、33.56、32.22、26.61、

20.92、18.67、13.63、13.58、13.33、12.39、12.32(テトラメチルシランからダウンフィールドした1ミリオン当りの部数)で主要なシグナルを示すジユウテロクロロホルム溶液中の90.5 MHz<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル、

によつて特徴づけられるOL-1957Bと称する抗微生物化合物およびその薬学的に許容し得る塩。

- 2) 19-(3,6-ジヒドロ-3-メチル-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル)-17-エチル-6-ヒドロキシ-9-(ヒドロキシメチル)-3,5,7,11,15-ペンタメチル-8-オキソ-2,10,12,16,18-ノナデカペンタエン酸の立体化学異性体およびその薬学的に許容し得る塩。

- 3) 前記特許請求の範囲第1項によつて定義さ

れるような化合物OL-1957Bおよびその薬学的に許容し得る塩。

- 4) 前記特許請求の範囲第2項に定義される少なくとも1種の化合物および薬学的に許容し得る担体からなる薬学的組成物。
- 5) 薬学的に許容し得る担体と一緒にした前記特許請求の範囲第1項におけるように定義される少なくとも1種の化合物OL-1957Bおよびその薬学的に許容し得る塩からなる薬学的組成物。
- 6) 同化性の炭素および窒素源を含有する培養培地中において好氣的条件下で半固体ATCC 39366として同定された放線菌の菌株を実質的な量のOL-1957Bが生産されるまで培養しそして次に該化合物を単離することからなるOL-1957Bの製造法。
- 7) 同化性の炭素および窒素源を含有する培養

培地中において好氣的条件下で抗菌性OL-1957B化合物を生産できるATCC 39366の同定特性を有する放線菌の精製された単離体。

- 8) 薬学的に許容し得る担体と一緒にした前記特許請求の範囲第1項に定義されたような化合物OL-1957Bまたはその薬学的に許容し得る塩の有効量を治療を必要とする哺乳動物に投与することからなる哺乳動物における微生物感染を治療する方法。
- 9) 薬学的に許容し得る担体と一緒にした前記特許請求の範囲第1項に定義されたような化合物OL-1957Bまたはその薬学的に許容し得る塩の有効量を治療を必要とする哺乳動物に投与することからなる哺乳動物における腫瘍を治療する方法。

### 3 発明の詳細な説明

本発明は、OL-1957Bと称する抗腫瘍活性を示

す抗菌性化合物およびその薬学的に許容し得る塩、該化合物の製法および該化合物を生産することのできる放線菌の精製された単離体に関するものである。

更に詳しくは、OL-1957B 抗菌性化合物を生産する方法は、単離体ATCC 39366として同定された放線菌の精製された単離体を使用する好気性發酵法に関する。

本発明の一見地によれば、抗菌性化合物 OL-1957B を生産することのできる ATCC 39366 の同定された特性を有する放線菌の精製された単離体が提供される。

本発明の他の見地によれば、同化性炭素および窒素源を含有する培地中で好気性条件下で ATCC 39366 として同定された放線菌の単離体を OL-1957B の実質的な量が生産されるまで培養しそして次に所望の化合物を単離することによつ

し得る担体と一緒にした化合物 OL-1957B またはその薬学的に許容し得る塩の有効量を投与することからなる哺乳動物における腫瘍を治療する方法が提供される。

本発明によれば、OL-1957B 抗菌性化合物は、OL-1957B の実質的な量が形成されるまで人工的条件下において放線菌の選択された単離体 ATCC 39366 を培養しそして次に所望の化合物を単離することによつて生産される。

本発明の目的に対して適合した放線菌の菌株は、USA のペンシルベニアで採取した土壌試料中に見出される。この微生物は、硝酸カリウム、硫酸マグネシウムおよび硫酸第一鉄のような塩およびグリセロールおよびアスパラギンのような炭素源を含有する適当な寒天平板培地を使用して土壌試料から単離される。微生物の菌株を寒天培地上に移植しそして一度移植したらすぐ

て OL-1957B を生産する方法が提供される。

本発明の他の見地によれば、抗微生物性および抗腫瘍性の両方の性質を示す抗菌性化合物 OL-1957B およびその薬学的に許容し得る塩が提供される。

本発明の他の見地においては、薬学的に許容し得る担体と一緒にした少なくとも 1 種の OL-1957B、その薬学的に許容し得る塩そして場合によつては他の追加的な抗微生物および（または）抗腫瘍化合物からなる薬学的組成物が提供される。

更に本発明の他の見地においては、薬学的に許容し得る担体と一緒にした化合物 OL-1957B またはその薬学的に許容し得る塩の有効量を投与することからなる哺乳動物における微生物感染を治療する方法が提供される。

本発明の他の見地においては、薬学的に許容

に有利な温度特に 45℃ で培養して土壌微生物を生育させる。

寒天平板技術によつて土壌試料から単離された OL-1957B 生産微生物は、放線菌の未同定単離体であつてそしてマリーランド 20852 のロックビレーのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、該寄託機関において ATCC 39366 として保管維持されている。OL-1957B を生産するこの微生物は、また、ミシガン 48105、アンナーパー、28000 ポリマウスロードのワーナーランバード/パークデビス・カルチャー・コレクションに凍結管、凍剤冷却バイアルおよび土壌管中の休眠培養菌として保管維持されておりそして該寄託機関において培養菌 WF-2053 と称されている。

抗微生物および抗腫瘍性の両方の性質を示す化合物 OL-1957B は、調節された条件下における

好氣的醱酵中に単離体ATOO 39366によつて生産される。醱酵培地は、炭素、窒素、鉱物質および発育因子源からなる。炭素源の例は、グリセロールおよびグルコース、マンノース、フラクトース、キシロース、リボースのような種々な簡単な糖またはデキストリン、澱粉、玉蜀黍粉および乳糖のような他の炭水化物含有化合物である。醱酵培地中の炭素源物質の通常の量は、約0.1～1.0重量%に変化する。

醱酵培地中の窒素源は、有機、無機または混合有機-無機物質である。このような物質の例は、綿実粉、大豆粉、玉蜀黍幼芽粉、玉蜀黍浸出液、デイスチラーズ・ドライド・ソリュース、落花生粉、ペプトン化ミルクおよび種々なアンモニウム塩である。

鉱物質および発育因子の添加もまたOL-1957B化合物の生産において助けとなる。醱酵培地鉱

物質添加物の例は、塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、炭酸カルシウム、塩化コバルト、および硫酸亜鉛を包含する。発育因子源は、種々な酵母およびミルク生成物を包含する。

OL-1957B化合物を生産する好適な方法は、液中培養醱酵による。本発明のこの実施態様によれば、醱酵成分を溶液または懸濁液となしそして次に混合物をオートクレーブ処理または水蒸気加熱によつて滅菌する。水性培地のpHを好適には約pH4～pH8の間に調整しそして混合物を滅菌後に約16～45℃に冷却する。冷却した滅菌醱酵培地に微生物を接種しそしてその後醱酵を通気および攪拌を使用して実施する。

液中培養法においては、醱酵は振盪-フラスコまたは静置タンク醱酵器中で実施する。振盪フラスコにおいては、通気は、培地と空気とを混合せしめるためにフラスコを攪拌することに

よつて達成される。静置タンク醱酵器においては、攪拌は、ディスクタービン、羽根車、オーブナータービンまたは船舶用プロペラの形態をとる羽根車によつて与えられる。通気は、攪拌混合物に空気または酸素を射出することによつて達成される。

OL-1957B化合物の水性生産は、通常これらの条件下において約2～10日後に達成される。

前述した方法に代る他の実施態様において、OL-1957B化合物は、また、微生物の固体状態醱酵によつて生産することができる。

以下の例は、当該技術に精通せし者が本発明を実施することができるようにするために与えるものでありそして本発明の単なる例示である。これら例は、特許請求の範囲によつて定義されるような本発明の範囲を限定するものとしてみられるべきではない。

#### OL-1957B化合物の醱酵生産

##### 例 1

寒天平板培地から単離した後の本発明の放線菌の培養物(ATOO 39366)をOIM 23培地を便した寒天斜面培養基に移しそして28℃で7～14日培養する。

#### 第 1 表

##### OIM 23 培地の処方

アミデックス玉蜀黍澱粉	10g
N-2アミン(型A)	2g
肉エキス(ジフコ)	1g
酵母エキス(ジフコ)	1g
塩化コバルト五水化物	20mg
寒 天	20g
蒸 留 水	1000ml

##### 例 2

前記寒天斜面培養基からの微生物生長物の一部を、BD-05種子培地5mlを含有する18mm×150

試験管に接種する。接種した種子を24℃、170 rpmで3～4日振盪する。

第Ⅱ表

## BD-05 種子増地の処方

アンペレックス1003(アンバー・ラボラトリーズ)	0.5%
グルコース-水化物[セロース(Celose)]	0.1%
デキストリン-アミデックスB 411(玉蜀黍生成物)	2.4%
N-Zケイス(フムコ・シエフィールド)	0.5%
噴霧乾燥した肉可溶性物(デイリン・ラボラトリーズ)	0.3%
炭酸カルシウム	0.2%

## 例 3

例2の微生物生長物1mlを、BM-57スクリーニング増地2.5mlを含有する185mlの振盪管に移す。

してpHは5.5～6.0の範囲にある。

この醗酵液の抗腫瘍活性を、1:100の希釈対組織培養で生長したL1210マウス白血病細胞において試験する。試験技術はデラン、グリーンベルグ、マツクドナルド、シュマツチヤーおよびアボットによつてCancer Chemotherapy Reports 3巻、3部2号(1972年)に十分に説明されている。比較対照条件下におけるこれらの細胞の生長と比較して0～35%のL1210白血病細胞生長割合を与える醗酵液は、活性であるとみなされる。0%がもつとも活性である。例3の醗酵液の観察された活性度は第Ⅳ表に示す通りである。

第Ⅲ表

## BM-57スクリーニング増地の処方

シュクローズ	1.5%
ラクトーズ	1.0%
ペプトン化ミルク	0.65%
魚粉	0.35%
トルラ酵母	0.25%

接種した振盪管を振盪(170 rpm 旋回振盪、行程5cm)しながら4日間24℃で培養する。DL-1957B化合物の生産を、初めてこの醗酵液において観察する。

微生物の醗酵活性を確認するために、例2からの微生物種子2mlを、300mlのバツフル付振盪フラスコ中に含有されているBM-57スクリーニング増地の第2の50mlバツチに接種する。この混合物を、振盪(170 rpm 旋回振盪、行程5cm)しながら24℃で4日間培養する。4日後に、醗酵液は外見上菌糸に対して粒がありそ

第Ⅳ表

## 例3からの醗酵液の抗腫瘍活性度(L1210マウス白血病細胞に対して測定した)

試 料	L1210細胞生長(%)
振盪管からの醗酵液	11
振盪フラスコからの醗酵液	6

また、例3からの粗製醗酵液を、寒天-ディスク法を使用した数種の微生物に対する抗微生物活性度について試験した。粗製醗酵液は、アグロバクテリウム・ツメファシエンシス、アルカリゲネス・ビスコラクテス、パセリウス・サブチリス、プランハメラ・カタルハリス、エシエリヒア・コリー、マイクロコッカス・ルテウスおよびマイクロコッカス・リソデイクチカスに対して活性であることが判つた。

## 例 4

それぞれがBM-57スクリーニング増地300mlを含有する2本の2L振盪フラスコに、微生

物種子 1.2 ml を接種する。フラスコを振盪(170 rpm 巡回振盪、行程 5 cm)しながら 24℃で 4 日培養する。

2本のフラスコからの醗酵液を集めそして組織培養で生長した L1210 マウス白血病細胞および生体内の P388 ねずみリンパ球白血病に対する抗腫瘍活性度について試験した。両方の試験を、前述した Cancer Chemotherapy Reports 3 巻、3 部 2 号 (1972 年) に記載されている方法によつて実施した。

粗製醗酵液は、試験管内で 6% まで L1210 細胞生長を制限することが観察された。生体内試験における P388 の結果は、第 V 表に示される通りである。データは、T/O % 値によつて示す。

$$T/O \% = \frac{\text{処殖したマウスの中央生存時間}}{\text{比較対照マウスの中央生存時間}} \times 100$$

醗酵器に滅菌的に移す。接種した広口びん内容物を、340 rpm で撹拌しそして 1 容量/容量/分の速度で空気を導入しながら 24℃で 24 時間培養する。

#### 例 6

それぞれ FM-10 生産培地 1.6 L を含有する 3 本の 30 L の撹拌広口びんを 121℃で 40 分オートクレーブ処理することによつて滅菌する。醗酵器および内容物を冷却しそしてそれぞれに例 5 からの微生物生長物約 800 ml を接種する。接種した生産広口びんを 300 rpm で撹拌しそして 1 容量/容量/分の速度で空気を導入しながら 24℃で 6 日間培養する。起泡を抑制するためにダウコーニング® 泡止め剤を使用する。

#### 第 V 表

例 4 からの醗酵液の抗腫瘍活性度 (生体内の P388 ねずみリンパ球白血病に対して測定した)

醗酵液の希釈	試験 1	試験 2
未希釈	毒性	—
1 : 2	66 (毒性)	59 (毒性)
1 : 4	146	126
1 : 8	—	140
1 : 16	—	117

#### 例 5

寒剤冷却バイアルからの培養物懸濁液 (1 ml) を解かしそして滅菌的に BD-05 種子培地 600 ml を含有する 2 L のバツフル付フラスコに移す。接種したフラスコ内容物を振盪 (130 rpm 巡回振盪、行程 5 cm) しながら 24℃で 72 時間培養する。

72 時間後に、種子フラスコの内容物を、BD-05 種子培地 1.6 L を含有する 30 L の広口び

#### 第 VI 表

##### FM-10 生産培地の処方

マルトース	1.5%
グルコース-水化物	1.0%
結実粉 (ファルマメジア)	0.75%
玉蜀黍粉	0.4%
トルラ酵母	0.25%

pH を NaOH で 6.5 に調整

OL-1957B 化合物の生産を、試験内における L1210 マウス白血病に対する試験によつておよび数種の微生物に対する抗微生物活性度を測定することによつて、醗酵サイクル中監視する。更に、pH および沈降率のような醗酵パラメータを、醗酵サイクル中記録する。データは第 VII 表に示す通りである。

## 第 VII 表

醗酵時間 (時間)	pH	沈降% (生長)	微生物の生長の阻止 阻止帯域直後 (mm) (12.7mm ディスクを使用)					観察した生物活性度 与えられた希釈における L 1210 マウス白血病細胞の生長%				
			E.コリー	B.サブチリス	M.ルテウス	1:100	1:500	1:1000	1:2500	1:5000		
0	6.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	6.4	4.7	—	—	—	NA*	—	—	—	—	—	—
48	5.9	7.4	21	23	15	5.7	1.6	—	—	—	—	—
69	5.2	8.0	19	23	16	6.2	0.4	—	—	—	—	—
96	5.15	8.7	19	20	16	5.7	0	—	—	—	—	—
120	6.0	12.0	19	19	17	—	0	1.5	2.8	2.9	—	—
144	6.1	15.3	21	19	17	—	0	1.3	2.9	3.2	—	—

\* NA = 活性でない

## 例 7

単離体 AT00 39366 の寒剤冷却保存培養物 1 ml を使用して 2 L のバツフル付振盪フラスコに含有されている BD-05 種子培地 600 ml に接種する。接種した振盪フラスコ内容物を、振盪(130 rpm 旋回振盪、行程 5 cm)しながら 24℃ で 71 時間培養する。

2 L のフラスコからの微生物生長物を使用して 30 L の攪拌広口びん醗酵器中に含有されている BD-05 種子培地 16 L に接種する。接種した醗酵器内容物を、300 rpm で攪拌しそして 1 容量/容量/分の速度で空気を導入しながら 24℃ で 24 時間培養する。

PM-10 生産培地 160 ガロン (606 L) を含有する 200 ガロン (757 L) の醗酵器を、121℃ で 40 分水蒸気で加熱することによつて滅菌する。醗酵器およびその内容物を 24℃ に冷却

しそして 30 L の攪拌広口びん醗酵器からの微生物生長物約 15 L を接種する。接種した生産培地を、155 rpm で攪拌しそして 0.75 容量/容量/分の速度で空気を導入しながら 24℃ で 5 日間培養する。醗酵培地の泡立ちを抑制するために、必要に応じてダウコーニング® 泡止め剤を加える。

OL-1957B 化合物の生産を、L 1210 マウス白血病細胞試験を使用することによつて、マイクロコックス・ルテウスおよびバチルス・サブチリスに対する醗酵液の抗微生物活性度を測定することによつておよび pH および沈降% のような醗酵パラメーターによつて醗酵サイクル中監視する。データは第 VII 表に示す通りである。

第 VII 表

醱酵時間 (時間)	pH	沈降率(生長)	生物活性度					
			微生物の生長の阻止 阻止帯域直径(mm) (12.7mmのディスクを使用)		与えられた希釈におけるL1210 マウス白血病細胞の生長率			
			M.ルテウス	B.サブチリス	1:100	1:500	1:2500	1:5000
0	6.35	—	—	—	—	—	—	—
24	6.65	4.7	0	0	NA*	—	—	—
52	6.10	7.4	14.0	20.5	5.0	4.5	—	—
72	6.0	8.7	16.5	21.5	6.8	3.8	—	—
96	5.9	11.3	16.5	23.5	—	5.5	5.0	16.4
116	6.0	14.7	18.0	20.0	—	0	3.8	3.1

\* NA = 活性でない

粗製醱酵液を収穫しそしてOL-1957B化合物を、  
以下に記載するようにして単離する。

#### OL-1957B化合物の化学的単離

##### 例 8

例7において製造した醱酵液を緩液中でpH3.5  
に調整しそして1時間酢酸エチル(227ml)と  
混合する。セライト545(11.4kg)を加えそ  
して混合物を46cmのプレートおよびフレーム  
フィルタープレスを通して濾過する。濾液を放  
置せしめて酢酸エチル抽出液から下部水性相を  
分離する。濾過ケーキを酢酸エチル(132ml)  
で洗浄しそして新鮮な酢酸エチル76mlでうす  
めた後この洗液を使用して前記からの分離した  
水性層を抽出する。混合物を静置せしめた後、  
第2の抽出からの水性および有機層を分離しそ  
して水性層を三回目に新鮮な酢酸エチル(189  
ml)で抽出する。3つの有機層を合しそして脱

イオン化水(95ml)で洗浄する。混合物を静  
置しそして水洗浄液を分離する。上部酢酸エチ  
ル層(529ml)を真空濃縮して31mlとなしそ  
して次に更に酢酸エチルをメタノールによつて  
置換することにより濃縮してメタノール性濃縮  
物4.5mlを得る。水浴容量でうすめたこの濃縮  
物を石油エーテル(沸点30~60℃)の4mlづ  
つで2回抽出しそして次に濃縮して約500ml  
にする。水によるメタノールの置換による連続  
濃縮によつて水性懸濁液約400mlを得、これ  
を酢酸エチル400mlづつで3回抽出する。酢  
酸エチル抽出液を合し、蒸水の緩液ナトリウム  
上で乾燥し、濾過し、小容量に濃縮しそして次  
に速乾およびセライト545(1:1)の混合物  
250gと混合する。得られたスラリーを真空  
蒸発して乾燥固体を得、これをジクロロメタン  
(300ml)でスラリー化しそしてジクロロメタ



ン中で充填した珪酸およびセライト545(1:1)の混合物4gを含有するカラムの頂部に加える。カラムをジクロロメタン(16L)で洗浄しそして次にジクロロメタン-メタノール(99:1、14L)、ジクロロメタン-メタノール(98:2、20L)およびジクロロメタン-メタノール(96:4、20.5L)で溶離する。ジクロロメタン-メタノール(96:4)溶離液を濃縮してOL-1957Bを含有する粘稠な油を得る。

#### OL-1957Bの精製

##### 例 9

珪酸-セライトクロマトグラフィーからの粗製OL-1957Bフラクションをn-ヘプタン500mlずつで2回すりつぶす。ヘプタン不溶性物質(18.9g)を、6cm(内部直径×60cm)のカラムに含有されている水1%で不活性化されたシリカゲル60(40~60μm粒子サイズ、E.メル

ク試薬)750g上でクロマトグラフィー処理する。カラムをジクロロメタン-メタノール(95:5)で溶離して9つの500mlずつのフラクションに集める。大部分のOL-1957B(HPLCおよびTLC試験によつて測定される)を含有するフラクション6および7を合しそして濃縮乾燥して部分的に精製された残留物4.6gを得る。更に、不銹鋼製カラム(7cm(内部直径)×85cm)に含有されている0.1g-シリカゲル(セブラライト0-18、40μm粒子サイズ、アナリチケム・インターナショナル)1.9g上のクロマトグラフィー処理によつて精製を行う。カラムを、メタノール-水(7:3)で溶離し、16の1Lずつのフラクションに集める。大部分のOL-1957B(HPLC試験による)を含有するフラクション11~15を合しそして濃縮して明るい黄褐色の固体のホーム状物として精製されたOL-

1957B 1.7gを得る。

OL-1957Bの化学的および物理学的性質は第Ⅱ表に示す通りでありそして化合物の紫外線、赤外線、360MHzプロトン磁気共鳴および90.5MHz<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトルは、それぞれ第1a図、第1b図、第1c図および第1d図に示される通りである。

第Ⅱ表

#### OL-1957Bの化学的および物理学的性質

性 質	OL-1957B
分 子 量	556原子質量単位
元素分析*	O <sub>33</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub> ・0.32CHCl <sub>3</sub> に対する計算値: O 67.28%、H 6.13%、O <sub>2</sub> 5.73% 実験値: O 66.92%、H 6.21%、 O <sub>2</sub> 5.62%
融 点	49~52℃(先だつて軟化する)
旋 光 度	(α) <sub>D</sub> <sup>25</sup> -15.7°(クロロホルム中0.7%)

紫外線吸収スペクトル 遊離液形態(メタノール中): 289nm(ε=0.33)で吸収、極大、260nm以下で末端吸収。  
カルボキシレート形態(メタノール中): 240nm(屈曲)、280nm(ε=0.75)および385nm(ε=0.24)で極大。

赤外線吸収スペクトル (クロロホルム中) 2970、2940、1715、1700(シヨルダー)、1640、1455、1375、1250、1100および965cm<sup>-1</sup>で主たる吸収ピーク。

360MHzプロトン磁気共鳴スペクトル(ジユウテクロロホルム溶液) 0.76(二重線、3-プロトン)、0.95(二重線、3プロトン)、1.03(三重線、3-プロトン)、1.05(二重線、3-プロトン)、1.17(二重線、3-プロトン)、1.74(多重線、1プロトン)、1.84(単一線、3-プロトン)、1.91(二重線の二重線、1プロトン)、2.06(多重線、2-プロトン)、2.11(単一線、3プロトン)、2.15(多重線、1プロトン)、2.18(四重線、2プロトン)、2.52(多重線、1プロトン)、2.65(多重線、1プロトン)、2.78(多重線、1プロトン)、3.60(多重線、2プロトン)、3.85(多重線、2プロトン)、4.96(二重線の二重線、1プロトン)、5.02(二重線、1プロトン)、5.20(二重線、1プロトン)、5.61(二重線の二重線、1プロトン)、5.66(単一線、1プロトン)、5.69(二重線の二重線、1プロトン)、5.98

(二重線、1プロトン)、5.99(二重線、1プロトン)、6.61(二重線、1プロトン)、および6.93(二重線の二重線、1プロトン)(テトラメチルシランからダウンフィールドした1ミリオン当りの部数)において主要なシグナル。

90.5 MHz  $^{13}\text{C}$  核磁気共鳴スペクトル(ジユウテロクロホルム溶液)

214.97、170.60、164.40、160.95、151.97、139.36、136.80、135.62、134.90、130.26、128.90、122.69、122.08、120.03、116.81、81.55、73.99、62.61、53.84、47.96、45.66、40.82、33.64、33.56、32.22、26.61、20.92、18.67、13.63、13.58、13.33、12.39および12.32(テトラメチルシランからダウンフィールドした1ミリオン当りの部数)において主要なシグナル。

保存時間(高圧クロマトグラフィ、 $\mu\text{Bondpak (TM)018}$ -シリカゲルカラム3.9mm(内部直径) $\times 30\text{cm}$ (MA、ミルフォードのウオーターズ・アソシエート)。  
溶剤: 0.05 M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 6.5)-アセトニトリル(45:55)。流

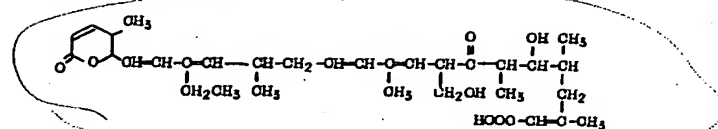
4.00分

速1.5 ml/分)

$R_f$ (シリカゲル60F 254(E.メルク)上の薄層クロマトグラフィ。溶剤: クロロホルム-メタノール(90:10))

\* 結晶クロロホルム溶剤を包含する化合物を基にして計算した元素分析値。

他の構造を除外して特定の構造を固守するものではないけれども、OL-1957Bの化学構造は図1に示したスペクトルデータと一致する以下の構造(I)によつて示される構造に相当するものと信じられる。



(I) (OL-1957B)

ラクトン環に結合している基の正確なシス-トランス配置および炭素-炭素二重結合に關す

る正確なE-Z配置は、本発明の出願時において確実には判っていない。それ故に、本発明は、上述した構造(I)のすべての可能なシス-トランスおよびE-Z異性体を包含するように企図するものである。上述した化合物の名称(シス-トランスまたはE-Z配置を具体的に示さないけれども)は、19-(3,6-ジヒドロ-3-メチル-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル)-17-エナル-6-ヒドロキシ-9-(ヒドロキシメチル)-3,5,7,11,15-ペンタメチル-8-オキソ-2,10,12,16,18-ノナデカペンタエン酸である。

本発明の化合物は、有機および無機塩基と薬学的に許容し得る塩を形成する。適当な無機塩基の例は、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カルシウム、重炭酸ナトリウムなどである。

薬学的に許容し得る塩は、また、陽イオンを形成するのに十分に強力な有機含鹽基塩基から誘導されるアミン陽イオンを使用して形成することもできる。

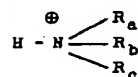
前記酸の薬学的に許容し得る塩は、例えば酸を水に懸濁しそしてpHを薬学的に許容し得る塩基で調整することによつてまたは溶剤中において化合物を薬学的に許容し得る塩基の一当量と反応せしめそして溶剤を減圧下で除去することによつて製造される。

薬学的に許容し得る金属陽イオンなる塩は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、亜鉛、鉄などのような金属から誘導された陽電荷のイオンを企図するものである。塩は、在来の方法で遊離酸形態の化合物を所望の塩基の相当する量と混合させることによつて製造される。遊離酸形態は、塩形態

態を酸で処理することによつて再生することができる。例えば、稀酸水溶液を利用してそれぞれの塩から遊離酸形態を再生することができる。稀水性塩酸が、この目的に対して適当している。遊離形態は、極性溶剤中の溶解度のようなある物理的性質においてそれぞれの塩形態とは若干異なっているが、塩は他の点においては本発明の目的に対してそれぞれの遊離形態と均等である。

薬学的に許容し得るアミン陽イオンなる語は、このような陽イオンを形成するのに十分に強力な有機含窒素塩基から誘導される陽電荷のアモニウムイオンおよび同様なイオンを企図するものである。遊離カルボキシル基を含有することによる化合物の薬学的に許容し得る非毒性の付加塩を形成する目的に対して有用な塩基は、限界が当該技術に精通せし者によつて容易に理

解される級を形成する。単に例示として、これらの級は、陽イオン形態として式



(式中、 $\text{R}_a$ 、 $\text{R}_b$  および  $\text{R}_c$  は独立して水素、約 1～6 個の炭素原子のアルキル、約 3～6 個の炭素原子のシクロアルキル、約 6 個の炭素原子のアリール、約 7～11 個の炭素原子のアラルキル、約 2～4 個の炭素原子のヒドロキシアルキルまたは約 8～15 個の炭素原子のモノアリールヒドロキシアルキルである。または、 $\text{R}_a$ 、 $\text{R}_b$  および  $\text{R}_c$  が結合している窒素原子と共に一緒になつて、 $\text{R}_a$ 、 $\text{R}_b$  および  $\text{R}_c$  の何れか 2 個は炭素、水素、酸素または窒素を含有する 5～6 員環の複素環式環の部分形成することができそして上記複素環式環および上記アリール基は置換されていないかまたは約 1～6 個の炭素原子を言

有する上記アルキル基によつてモノ-またはジ-アルキル置換されている)の級を包含すると言ふことができる。それ故に、アモニウムまたは塩基性アミンから誘導された薬学的に許容し得る陽イオンからなる  $\text{R}_a$ 、 $\text{R}_b$  および  $\text{R}_c$  基の例は、アモニウム、モノ-、ジ-およびトリメチルアモニウム、モノ-、ジ-およびトリエチルアモニウム、モノ-、ジ-およびトリプロピルアモニウム(イソおよびノルマル)、エチルジメチルアモニウム、ベンジルジメチルアモニウム、シクロヘキシルアモニウム、ベンジルアモニウム、ジベンジルアモニウム、ピペリジニウム、モルホリニウム、ピロリジニウム、ピペラジニウム、ピリジニウム、1-メチルピペリジニウム、4-エチルモルホリニウム、1-イソプロピルピロリジニウム、1,4-ジメチルピペラジニウム、1- $\alpha$ -ブチルピ

ペリジニウム、2-メチルピペリジニウム、1-エチル-2-メチルピペリジニウム、モノ-、ジ-およびトリエタノールアモニウムエチルジエタノールアモニウム、 $\alpha$ -ブチルモノエタノールアモニウム、トリス(ヒドロキシメチル)メチルアモニウム、フェニルモノエタノールアモニウムなどである。

#### OL-1957Bの生物学的活性度

##### 例 10

OL-1957Bの抗微生物活性度は、12.7 mmの紙板を10、100および500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で製造したOL-1957Bの溶液で飽和しそしてそれぞれの飽和した紙板を特定の微生物の種子をまいた寒天培地を含有する生物試験皿上にかくことによつて評価する。紙板および接種した培地を37℃で16時間培養しそしてもしあるならば得られた生長阻止帯域の直径を測定する。これらの試験からのデータは図X段に示す通りである。

## 第 X 表

微 生 物	培養菌番号*	培 地	阻止帯域の直径 (mm)		
			OL-1957B		
			500 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL
アルカリゲネス・ビスコラクチス	AT0021698	マ イ シ ン	0	0	0
バチルス・サブチリス	AT006633	# 169	21	0	0
バチルス・サブチリス	PD04969	# 169	15	0	0
バチルス・サブチリス	AT006633	マ イ シ ン	0	0	0
エシエリヒア・コリー	AT0010536	GAA	0	0	0
クロエケラ・プレビス	PD M1378	# 69	0	0	0
ブランハメラ・カタルハリス	PD 03596	GAP	27	14	0
ペニシリウム・アベラネウム	PD M2988	H & B	0	0	0
プロテウス・ブルガリス	PD 05062	PAB	0	0	0
ミクロコッカス・ルテウス	PD 05064	PAB	14	0	0
スタフィロコッカス・オウレウス	PD 02482	PAB	20	0	0
スタフィロコッカス・オウレウス	PD 5045	AM-10	28	18	0
スタフィロコッカス・オウレウス	PD 5045	AM-9	26	26	0
キサントモナス・フアセオリ	PD 06002	CMA	0	0	0

\* AT00 = メリーランド(20852) ロックビル社のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション

PD = ミシガン(48105) アンダーバー、プリンスロー V-2800 のワーナーランバート/パーク・デビス・カルチャー・コレクション

## 例 1 1

マウスにおける P388 白血病に対する OL-1957B の生体内活性度を、Cancer Chemotherapy Reports 3 巻 3 部 1 ~ 87 頁 (1972 年) に確立されているプロトコールを使用して試験する。マウスを 0 日目に腹腔内に感染しそして次に 1 ~ 5 日目に第Ⅱ表に示した OL-1957B の使用量を与える。これらの試験の結果は、前述したように T/O 値によつて第Ⅱ表に示される通りである。

第Ⅱ表

マウスにおける P388 白血病に対する OL-1957B 生体内活性度

OL-1957B 使用量 ( $\mu$ g/kg/注射)	T/O 値	
	試験 - 1	試験 - 2
200	毒性	毒性
100	154	毒性
50	143	161
25	139	148
125	111	136

## 例 1 2

L1210 マウス白血病細胞および人結腸腺癌細胞に対する OL-1957B の細胞毒性を試験管内で測定した。LD<sub>50</sub> 値は第Ⅲ表に示す通りである。

第Ⅲ表

化合物	LD <sub>50</sub>	
	L1210 マウス白血病細胞	人結腸腺癌細胞
OL-1957B	0.185ng/mL	0.13ng/mL

## 例 1 3

この例においては、OL-1957B の生体内活性度を、以下の通りマウスにおけるリジウエイ骨肉腫 (Ridgway Osteogenic Sarcoma) に対して試験した。0 日目に群を処理するために雄の AER マウスを採め、リジウエイ骨肉腫の 30 ~ 60 日部分を使用して套管針によつて皮下に接種し、再び採めそして不規則に分布させる。

2、6 および 10 日そして次にその後 1 週間

毎に0.9%塩化ナトリウム溶液に溶解した試験化合物を適当なマウスに腹腔内に注射する。腫瘍を24日および35日目に測定する。結果は、T/O%（以下に定義されるような）として第XIII表に示す通りである。35日目に於ける40以下のT/O%値は活性であるとみなされる。

$$T/O\% = \frac{\text{試験動物の腫瘍サイズ}}{\text{比較対照動物の腫瘍サイズ}} \times 100$$

第XII表

マウスにおけるリジウエイ骨肉腫に対するOL-1957Bの活性度

使用量 (mg/体重kg/注射)	T/O%	
	24日目	35日目
0.375	11	17
0.188	30	54

例 14

マウスにおけるB16黒色腫に対するOL-1957Bの生体内活性度を、Oancer Chemotherapy Reports 3巻、3部1~87頁(1972年)に

確立されたプロトコールを使用して試験する。マウスを0日目にB16黒色腫を使用して套管針によつて接種しそして次に1、5および9日目にOL-1957Bを腹腔内に与える。B16黒色腫に対する化合物の活性度は、T/O%値によつて第XIV表に示される通りである。この値は、%として示した未処理のマウスに対する処理したマウスの中央予想寿命(日)の比を示す。

第XIV表

マウスにおけるB16黒色腫に対するOL-1957Bの活性度

使用量 (mg/体重kg/注射)	T/O%
0.75	18
0.375	141
0.188	141
0.094	151

遊離成形または1種またはそれ以上の薬学的に許容し得る塩の形態の抗微生物化合物OL-

1957Bは、相容性の薬学的に許容し得る担体と一緒にした薬学的組成物としてその抗微生物および抗腫瘍活性に対して有用である。これらの組成物は、また、他の抗微生物剤および(または)抗腫瘍剤を含有することができる。組成物は、所望の投与方法に対して適当した薬学的に適当な形態の何れかの形態になし得る。このような形態の例は、錠剤、カプセル、ピル、粉剤および顆粒のような経口投与に対する固体形態、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキサーのような局処または経口投与に対する液状形態および液固溶液、懸濁液またはエマルジョンのような非経口投与に適当した形態を包含する。

本発明の化合物から薬学的組成物を製造するのに、不活性の薬学的に許容し得る担体は、固体または液体であり得る。固体形態の製剤は、粉剤、錠剤、分散性顆粒、カプセル、カシエー

および坐剤を包含する。固体の担体は、稀釈剤、風味剤、可溶化剤、潤滑剤、懸濁剤、結合剤または錠剤崩壊剤として作用する1種またはそれ以上の物質であり得る。それは、また、カプセル化物質であつてもよい。粉剤においては、微細な活性化合物と混合される微細な固体である。錠剤においては、活性化合物を必要な結合性を有する担体と適当な割合で混合しそして所望の形状およびサイズに圧搾する。粉剤および錠剤は、好適には活性成分5または10~約70%を含有する。適当な固体担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトーズ、ペクチン、デキストリン、澱粉、ゼラチン、トラガントゴム、メチルセルローズ、ナトリウムカルボキシメチルセルローズ、低融点ワックス、ココアバターなどである。製剤なる語は、活性成分(他の担体を有するかまたは

有しない)が、担体によつて固まれ、かくして活性成分が担体と一緒になっているカプセルを与える担体としてのカプセル化物質と活性化化合物の処方を包含するように企図するものである。尚様に、カシエーも包含される。錠剤、粉剤、カシエーおよびカプセルは、経口投与に適当した固体の使用形態として使用することができる。

坐剤の製造に対しては、脂肪酸グリセライドまたはココアバターの混合物のような低融点ワックスをはじめに融解しそして活性成分を撹拌によつてその中に均質に分散させる。次に融解した均質な混合物を在来のサイズの型に注入し、冷却せしめそしてそれによつて固化せしめる。

液状形態の製剤は、溶液、懸濁液およびエマルジョンを包含する。例として、非経口注射に対する水または水-プロピレングリコール溶液をあげることができる。液状製剤は、また、ボ

リエチレングリコール溶液中の溶液として処方することもできる。経口的使用に対して適当した水溶液は、活性成分を水に溶解しそして所望に応じて適当な着色剤、風味料、安定剤および酸化剤を加えることによつて製造される。経口的使用に対して適当した水性懸濁液は、微細な活性成分を粘稠な物質例えば天然または合成ゴム、樹脂、メチルセルローズ、ナトリウムカルボキシメチルセルローズ、および他の公知の懸濁剤と共に水に分散することによつて製造することができる。

また、使用直前に経口または非経口投与用の液状形態の製剤に変換されるように企図した固体形態の製剤も包含される。このような液状形態は、溶液、懸濁液およびエマルジョンを包含する。これらの特定の固体形態の製剤は、もつとも有利には単位使用形態で与えられそしてそ

のまま使用して単一の液状使用単位を与える。このようにする代りに、液状形態に変換した後、注射器、茶さじまたは他の容量測定容器によつて液状形態の製剤の予定された容量を測定することにより多数回の個々の液状使用量を得ることができるように十分な固体を与えることができる。多数回の液状使用量をそのように製造する場合は、可能な分解を遅延するために液状使用量の未使用部分を低温度(即ち冷却下)に維持することが好適である。液状形態に変換されるように企図された固体形態の製剤は、活性物質以外に、風味剤、着色剤、安定剤、緩衝剤、人工および天然甘味剤、分散剤、酸化剤、可溶化剤などを含有し得る。液状形態の製剤を製造するために利用される液体は、水、等張水、エタノール、グリセリン、プロピレングリコールなどならびにこれらの混合物である。普通、

利用される液体は、投与方法に関して選定される。例えば、大量のエタノールを含有する液状製剤は非経口的使用に対して適当していない。

好適には、薬学的製剤は、単位使用形態にある。このような形態においては、製剤は活性成分の適当な量を含む単位使用に再分割される。単位使用形態は、不連続の量の製剤例えば包装した錠剤、カプセルおよびバイアルまたはアンプル中の粉末を含む包装した製剤であつてもよい。単位使用形態は、また、カプセル、カシエーまたは錠剤それ自体であつてもよくまたはそれは包装した形態のこれらの何れかの適当な数であつてもよい。

製剤の単位使用における活性化化合物の量は、特定の適用および活性成分の力価によつて0.1~500mg好適には5~100mgに変化または調節することができる。組成物は、また、もし

必要ならば、他の相容性の治療剤を含有することができる。

治療的使用において、70 kgの患者に対する哺乳動物の使用量範囲は、1日につき体重1 kg当り1~1500 mgまたは好適には1日につき体重1 kg当り2~750 mgである。しかしながら、使用量は、患者の必要条件、治療される病気の程度および使用される化合物によつて変化することができる。特定の状況に対する適当な使用量の決定は、当該の技術の範囲にある。一般に、治療は、化合物の最過量より少ない小使用量で開始される。その後、使用量は、状況下における経過の効果に適するまで小増加量によつて増大する。便宜上、もし必要ならば、全体の一日当りの使用量を分割しそして小量づつ投与することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1、第2、第3および第4図は、それぞれ0L-1957Bのメタノール中の紫外線、クロロホルム中の赤外線、重水中の360 MHzプロトン磁気共鳴および90.5 MHz <sup>18</sup>O核磁気共鳴スペクトルである。

特許出願人 ワーナー・ランバート・コンパニー

代理人 弁理士 山下



第1頁の続き

©Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 17/06  
C 12 R 1:01)

②発明者

ジョゼフィノ・ビー・  
タナック

アメリカ合衆国ミシガン州 48098 トロイ・コリントン  
ドライブ 5284

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**